

УДК 577.21:633.1

E. K. ТУРУСПЕКОВ

## АНАЛИЗ SNP-МАРКЕРОВ ЯДЕРНОГО И ХЛОРОПЛАСТНОГО ГЕНОМОВ ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ ЗЛАКОВЫХ КАЗАХСТАНА

(Институт биологии и биотехнологии растений (ИББР), г. Алматы)

В результате экспедиционных сборов в Южно-Казахстанской и Восточно-Казахстанской областях Казахстана собраны растения 14 различных дикорастущих видов злаковых растений. Анализ SNP-маркеров ядерного (ITS) и хлоропластного (*matK*, *rpoC* и *trnL*) геномов позволил выявить уровень изменчивости вовлеченных в анализ ДНК-маркеров и изучить дифференциацию между анализированными дикорастущими видами Казахстана. Сравнительный анализ уровня генетического разнообразия SNP-маркеров позволил сделать заключение о том, что *matK* (0.030) является наиболее полиморфным ДНК-маркером, наиболее приемлемым для изучения молекулярной систематики дикорастущих злаковых культур. Результаты молекулярного анализа дикорастущих видов Казахстана использованы как для сравнительного изучения генетического разнообразия растений, собранных в Казахстане, так и для создания электронной базы данных изученных образцов с использованием ДНК-дескрипторов.

**Введение.** Формирование коллекций генетических ресурсов дикорастущих злаковых в качестве диких сородичей зерновых культур актуально в современных условиях как для сохранения их биоразнообразия, так и для интеграции в мировую систему генетических коллекций с учетом международных классификаторов и существующих баз данных.

В результате интенсивного культивирования сельскохозяйственных культур и существующей угрозы сужения уровня генетического разнообразия проблема поиска новых источников разнообразия среди дикорастущих предшественников и сородичей, хранения, обмена и использования генетических ресурсов и информации является одной из главных приоритетов современной генетики и селекции. Н. И. Вавилов в основу своих исследований положил идею Ч. Дарвина о том, что «каждый вид локализован в его начальном происхождении, эволюция исторична и поэтому знание истоков вида, путей его географического расселения имеет решающее значение в понимании путей эволюции, в овладении ее этапами, в прослеживании динамики эволюционного процесса» [1, 2]. В работах Н. И. Вавилова представлены три концепции – Центры происхождения, Центры формообразования и Центры разнообразия возделываемых растений [3]. Им было отмечено «скопление» доминантных генов в центрах ареалов вида и рецессивных (мутантных) генов на их периферии. Морфо-физиологические, физиолого-биохимические, биометрические, структурные и другие показатели, вошедшие в

вавиловские паспорта образцов ВИРа, позволили выявить и впоследствии эффективно использовать в селекции многие источники гермоплазмы для создания новых сортов и гибридов растений с необходимыми важнейшими признаками (устойчивость, качество, скороспелость, многолетность).

Создание, сохранение и улучшение растительных ресурсов в виде генетических коллекций – одна из актуальных проблем современной биологии и селекции. Общая современная мировая тенденция в исследованиях генетических ресурсов растений заключается в 1) создании генетических коллекций с идентифицированными аллелями генов с аспектом на их географическое распространение и 2) составлении детальных генетических карт с целью полного секвенирования генома. Генеральной задачей в глобальном масштабе является создание и описание довольно представительной генетической коллекции, отвечающей самым разнообразным запросам пользователей, в конечном итоге направленной на улучшение генофонда зерновых культур, в том числе в связи с продовольственной безопасностью.

Известны многие аспекты использования генетических коллекций растений, в том числе в качестве эталонов. В этом случае образцы, включенные в генетическую коллекцию, служат своего рода стандартами для выявления новых аллелей генов, структурных особенностей хромосом или каких-либо других новых характеристик генотипа. Такая работа особенно важна для

злаковых культур, интенсивно исследуемых генетиками всего мира. Постоянно возникает потребность в сопоставлении полученных данных, что возможно только при сравнении изучаемых форм с международно-известными эталонами. Многолетние усилия генетиков из разных стран привели к созданию централизованной сборной коллекции ячменя, хотя многие региональные центры и организации по-прежнему обоснованно имеют свои базовые коллекции [4–7].

Сбор и анализ экземпляров дикорастущего ячменя, эгилопса и примитивных культурных форм из ранее неизученных или слабоизученных регионов, в том числе и в сравнительном аспекте с другими родственными видами трибы *Triticeae* является одним из главных приоритетов в изучении разнообразия злаковых с использованием методов молекулярных маркеров. Существенно ускоряет и упрощает задачу выявления молекулярных маркеров использование методов, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР), представляющей собой амплификацию определенных участков ДНК *in vitro* в процессе повторяющихся температурных циклов полимеразной реакции. Задачей данной работы явилась оценка информативности SNP-маркеров (single nucleotide polymorphism – полиморфизм по единичному нуклеотиду) ядерного и хлоропластного геномов в изучении генетического разнообразия дикорастущих видов злаковых, произрастающих в Казахстане. Актуальность использования данного подхода как для развития генетики и селекции зерновых культур в целом, так и для формирования и сохранения коллекций генетических ресурсов растений, документирования, создания информационного банка данных, организации хранения генофонда заключается в том, что комплексное изучение и характеристика генетических ресурсов ячменя, и в том числе использование методов молекулярных маркеров, эффективны для пополнения, оценки, поддержания и рационального использования ценных генетических коллекций [8, 9].

## Материал и методы исследований

**Объекты исследований:** 1) образцы видов ячменя (*Hordeum spontaneum*, *Hordeum brevisubulatum*, *Hordeum bulbosum*, *Hordeum murinum*, *Hordeum leporinum* и *Hordeum jubatum*); 2) эгилопсов (*Aegilops cylindrica*, *Aegilops triuncialis*,

*Aegilops crassa*, *Aegilops searsii*, и *Aegilops tauschii*); 3) образцы растений 2 видов ковыля: *Stipa capillata* и *Stipa pennata*; 4) *Agropyron pectinatum*; 5) (*Triticum urartu*, *Triticum monococcum*, *Triticum timopheevii*, *Triticum dicoccoides*, и *Triticum aestivum*). Объекты исследований с 1 по 4 были собраны в Южно-Казахстанской и Восточно-Казахстанской областях. Объекты исследований рода *Triticum* были получены ранее из других научных учреждений мира.

## Методы исследований

Выделение тотальной ДНК проводили по Делапорта [10]. О качестве выделенной ДНК судили по отношению величин оптической плотности  $OD_{260}/OD_{280}$ . Для выявления микросателлитных маркеров применяли метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием различных праймеров [11]. Реакционная среда для амплификации включала 0.2 мМ каждого dNTP, 250 мкМ каждого праймера, 1.5 мМ  $MgCl_2$ , 1 ед. *Taq*-полимеразы, 50–100 ng исследуемой ДНК. Полимеразную цепную реакцию, включающую предварительную денатурацию тотальной ДНК при 94°C в течение 1 мин., последующие 30–40 циклов (94 °C – 1 мин., 50–60°C – 30 с, 72°C – 1 мин.) и элонгацию при 72°C – 5 мин., проводили на термоамплификаторе. Количество циклов и температура отжига зависели от используемого в реакции праймера.

Продукты амплификации, полученные в результате полимеразной цепной реакции, разделяли электрофоретически в 2-процентном агарозном геле и в 6% полиакриламидном геле, визуализировали в результате окрашивания в растворе бромистого этидия или серебряным окрашиванием [12], соответственно.

Для изучения генетического разнообразия на основе использования SNP-маркеров ядерного и хлоропластного геномов нами были использованы олигонуклеотидные праймеры, приведенные в табл. 1. Очистку продуктов полимеразной цепной реакции проводили с помощью коммерческого кита ULTRA PreP PCR-Kit компании «AHN Biotechnologie GmbH» (Nordhausen, Germany). Анализ нуклеотидных последовательностей ПЦР-продуктов проводили по методике «прямого секвенирования» с помощью ДНК-анализатора ABI3130 (Applied Biosystems) с использованием набора BigDye Terminator v3.0.

Таблица 1. SNP-маркеры ядерного и хлоропластного геномов, использованные в работе

№	Маркер	Праймеры (5'-3')	Геном
1	ITS	F-TCCTCCGCTTATTGATATGC R-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG	Ядерный
2	trnL	F-GGAAATGGGGATATGGCG R-ATTTGAACCTGGTGACACGAG	Хлоропластный
3	grpC	F-GTGGATAACACTTCTTGATAATGG R-TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC	Хлоропластный
4	matK	F-CCTATCCCATCTGGAAATCTTAG R-GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG	Хлоропластный

Для построения дендрограммы использовали прикладную программу Mega 4.0.

### Результаты и обсуждение

**Изучение генетического разнообразия дикорастущих злаков Казахстана с использованием SNP-маркеров ядерного генома.** Проведена работа по оптимизации этапов анализа SNP (*single nucleotide polymorphism*) маркеров ядерного и хлоропластного геномов. В качестве маркера ядерного генома был выбран ITS (*internal transcribed spacers*) участок рибосомального ДНК. Для определения нуклеотидной последовательности ITS использовали праймеры ITS5 и ITS4 [13].

Всего было изучено 9 дикорастущих видов Казахстана и 15 растений вида *H. spontaneum*. При сравнении нуклеотидных последовательностей всех видов было обнаружено 17 мутационных сайтов. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей 15 образцов *H. spontaneum*

не позволил выявить полиморфизм по данному маркеру, что свидетельствует о неэффективности использования данного маркера для изучения внутривидового разнообразия. Вместе с этим, результаты позволили четко группировать образцы по видовой и родовой принадлежности (рис. 1). Уровень генетического разнообразия по ITS-маркеру между видами варьировал от 0.005 между видами *H. jubatum* и *H. leporinum* и 0.044 между видами *A. triuncialis* и *H. leporinum*, и в среднем составил 0.025.

Анализ дендрограммы позволяет выделить два отчетливых кластера по принадлежности к родам *Hordeum* и *Aegilops* (рис. 1).

**Изучение генетического разнообразия дикорастущих злаков Казахстана с использованием SNP-маркеров хлоропластного генома.** В качестве маркеров хлоропластного генома были выбраны маркеры *matK*, *trnL* и *grpC*. Дизайн праймеров для маркеров хлоропластного генома был сделан на основе секвенированного генома ячменя.

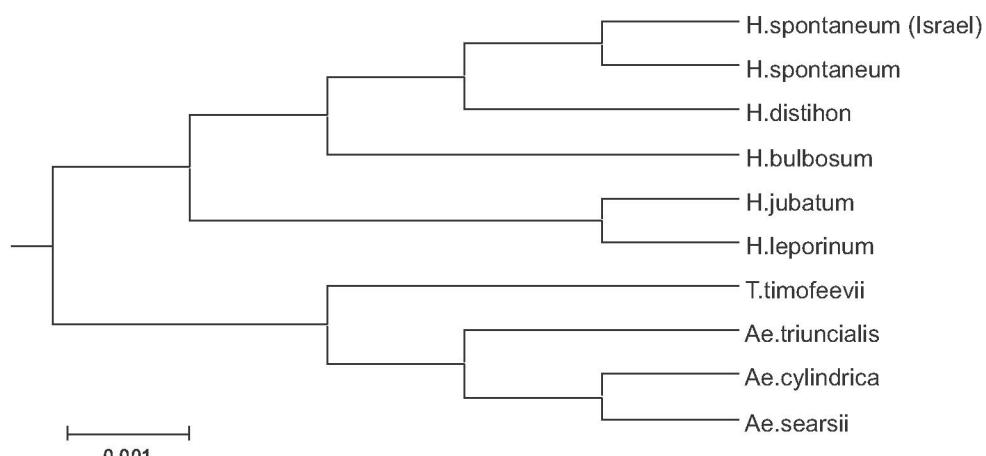
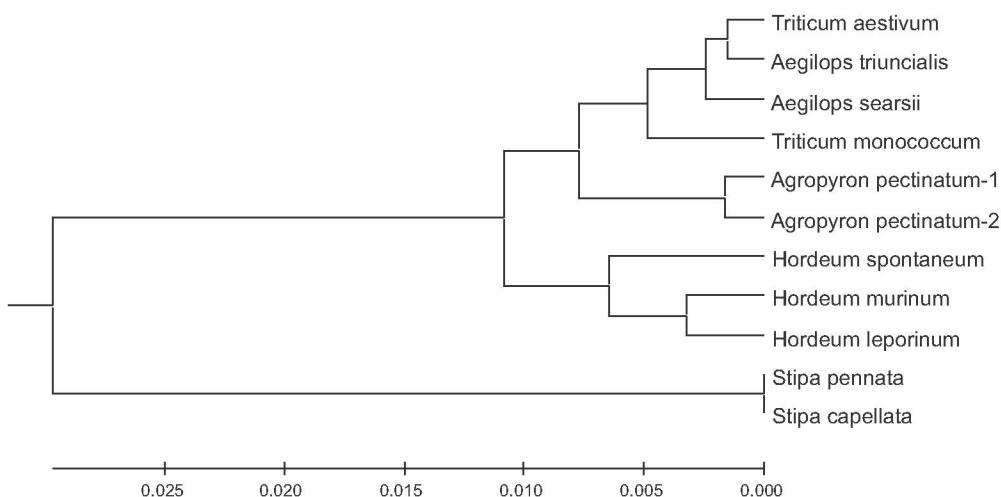


Рис. 1. Дендрограмма филогенетического анализа дикорастущих видов *Hordeum*, *Triticum* и *Aegilops* по ITS-маркеру ядерного генома

Для изучения генетического разнообразия дикорастущих злаковых на основе использования SNP-маркеров использовали образцы трех популяций *H. spontaneum* (каждая популяция была представлена 5 растениями), и по растениям видов рода *Hordeum*, *Triticum*, *Aegilops*, *Agropyron* и *Stipa* (рис. 2). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей 15 образцов *H. spontaneum* по маркеру *matK* не позволил выявить внутри популяционного и внутривидового полимор-

физма. Вместе с этим, анализ данных образцов по данному маркеру позволил выявить межвидовой полиморфизм для всех изученных видов дикорастущего ячменя (рис. 2). При сравнении нуклеотидных последовательностей всех видов было обнаружено 24 мутации. Уровень генетического разнообразия варьировал от 0 между двумя видами рода *Stipa* до 0.067 между видами *Stipa pennata* и *Triticum monococcum*, и в среднем составил 0.03.

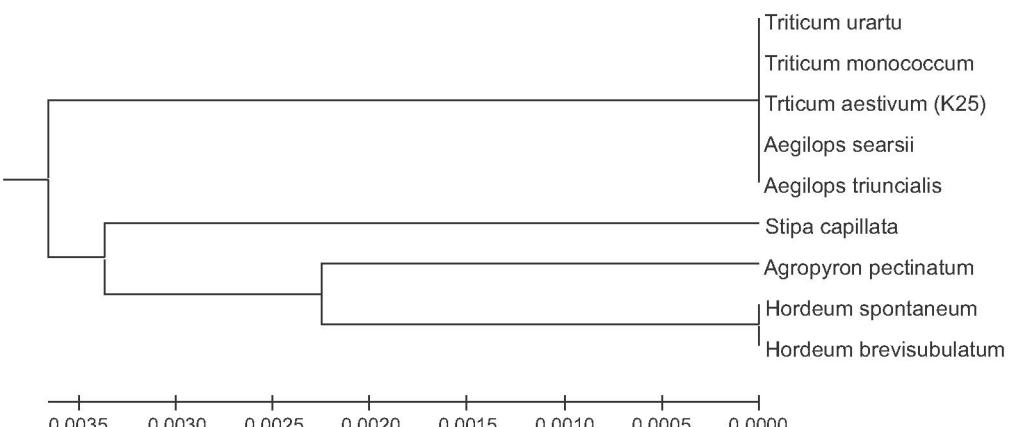


**Рис. 2.** Филогенетический анализ 5 видов рода *Hordeum* на основе сравнения нуклеотидных последовательностей *matK*

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что *matK* является информативным маркером для межвидовой дифференциации.

Для изучения межвидового разнообразия по гену *rpoC* нами были изучены 9 видов родов *Hordeum*, *Triticum*, *Aegilops*, *Agropyron* и *Stipa*.

Уровень среднего разнообразия по данному гену составил 0.004 и значительно уступал разнообразию по гену *matK* (0.030). Анализ полученной дендрограммы позволил определить в одну группу все образцы видов родов *Triticum* и *Aegilops* и разделить их от других изученных родов (рис. 3).



**Рис. 3.** Дендрограмма анализа хлоропластного гена *rpoC*, изученного для 9 различных дикорастущих видов злаковых

Несколько выше уровень генетического разнообразия, чем по гену *rpoC*, был выявлен при изучении дикорастущих видов с помощью гена *trnL* (0.006). Результаты анализа филогenetического дерева по гену *trnL*, построенного на основе анализа генетического расстояния между 20 видами родов *Hordeum*, *Triticum*, *Aegilops*, *Agropyron* и *Stipa* представлены на рис. 4. Как и в предыдущих случаях, анализ гена

*trnL* позволил четко разделить виды по родам, за исключением близкородственных родов *Triticum* и *Aegilops*, которые были представлены несколькими группами. Интересно отметить тот факт, что образец вида *Agropyron pectinatum* расположился между видами *Hordeum* и *Aegilops*, тогда как два вида рода *Stipa* были помещены на значительном расстоянии от всех других видов.

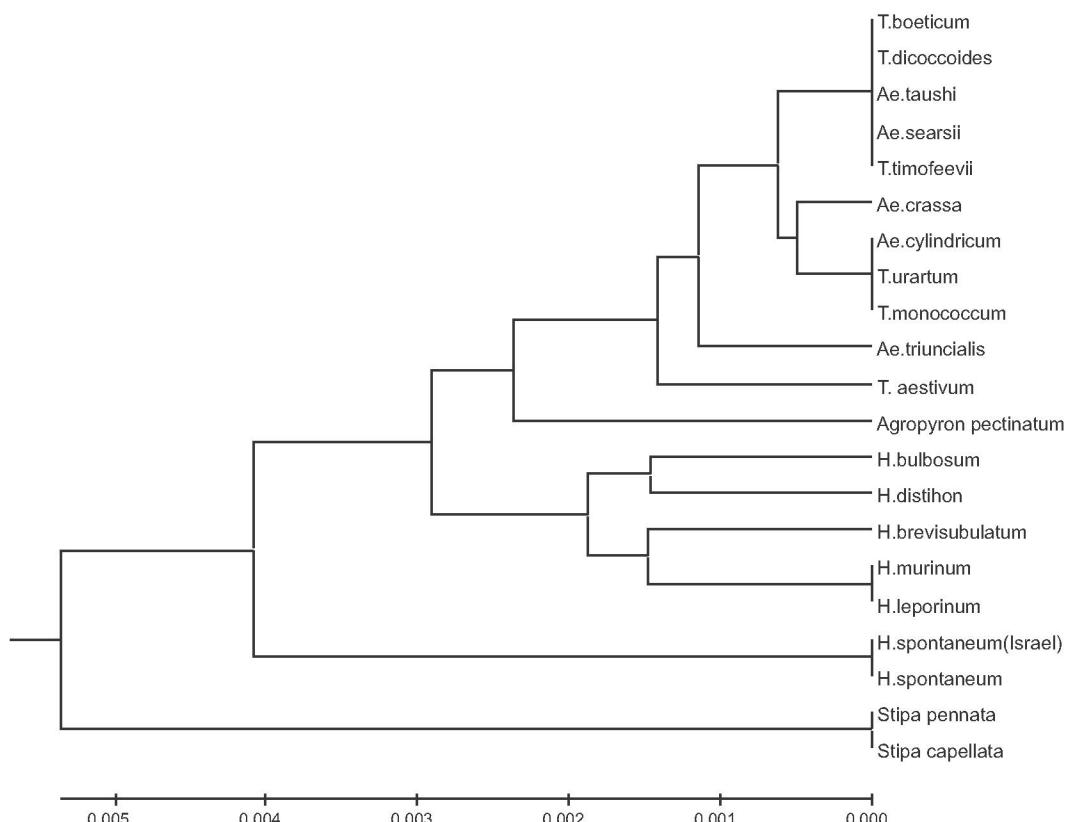


Рис. 4. Филогенетическое дерево 20 видов дикорастущих злаков, построенное на основе использования хлоропластного гена *trnL* и метода UPGMA

Сравнительный анализ генетического разнообразия свидетельствует о том, что уровень внутригенного полиморфизма маркеров хлоропластного генома был выше у *matK* (0.03), тогда как полиморфизм генов *trnL* (0.006) и *rpoC* (0.004) был почти на порядок ниже. Более того, полиморфизм гена *matK* был также выше, чем у ITS (0.025), гена ядерного генома, что предполагает его использование в качестве главного дискриминатора при изучении систематики того или иного вида.

Таким образом, проведена первичная работа по оценке генетического разнообразия дикорастущих видов ячменя Казахстана с использова-

ния SNP-маркеров и заложены основы для изучения молекулярной систематики дикорастущих видов растений Казахстана.

**Заключение.** Результаты исследований использованы для сравнительного изучения генетического разнообразия дикорастущих видов Казахстана с использованием SNP-маркеров ядерного и хлоропластного геномов и описания генетических коллекций и банка ДНК с использованием ДНК-дескрипторов. Анализ дикорастущих видов с использованием SNP-маркера ядерного генома (ITS), и трех маркеров хлоропластного генома (*matK*, *rpoC* и *trnL*) позволил четко определить различия на межвидовом уровне.

Результаты работы свидетельствуют о высоких возможностях использования SNP-маркеров в изучении молекулярной систематики дикорастущих злаковых видов.

Практическая значимость работы заключается в формировании коллекции и создании банка данных и паспортов ценных генотипов (популяций) по морфологическим и генетическим параметрам и признакам генетических ресурсов дикорастущих злаков.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вавилов Н.И. Центры происхождения культурных растений // Труды по прикладной ботанике и селекции. 1926. Т. 16. С. 2.
2. Вавилов Н.И. Учение о происхождении культурных растений после Дарвина: (доклад на сессии АН СССР. 28 нояб. 1939 г.) // Советская наука. 1940. № 2. С. 55-75.
3. Гончаров Н.Н. Центры происхождения культурных растений // Вестник ВОГИС. 2007. Т. 11, № 3/4. С. 561-574.
4. Туруспеков Е.К. Генетическое разнообразие и филогенез ячменя // Биотехнология. Теория и практика. 2005. № 3. С. 7-20.
5. Valkoun J., Konopka J. Global Inventory of Barley Genetic Resources // Proceedings of 9th IGBS, Brno, Czech Republic, 2004. P. 31-38.
6. Waugh R., Caldwell D., Rostoks N., Druka A., Druka I., Marshall D., Muehlbauer G., Russell J., Ramsay L. Current perspectives in barley genomics // Proceedings of 9th IGBS, Brno, Czech Republic, 2004. P. 93-102.
7. Туруспеков Е.К., Абугалиева С.И., Мендлингер С., Волис С. Полиморфизм популяций дикого ячменя *Hordeum spontaneum* K. из Туркменистана // Генетика. 1996. Т. 32, № 6. С. 767-773.
8. Kraic J., Gregova E., Jomova K., Hudcovicova M. Microsatellite markers discriminating accessions within collections of plant genetic resources // Cellular and Molecular Biology Letters. 2002. V. 7. P. 745-751.
9. Zhang LY, Ravel C, Bernard M, Balfourier F, Leroy P, Feuillet C, Sourdille P. Transferable bread wheat EST-SSRs can be useful for phylogenetic studies among the Triticeae species // Theoretical and Applied Genetics. 2006. V. 113(3). P. 407-418.
10. Delaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA minipreparation. Version II // Plant Molecular Biology Reports. 1983. V. 4. P. 19-21.
11. Roder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Leroy P., Ganap M.W. A microsatellite map of wheat // Genetics. 1998. V. 149. P. 2007-2023.
12. Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G., Gresshoff, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels // Analytical Biochemistry 1991. V. 195. P. 80-83.
13. Baldwin B. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae // Molecular Phylogenetics and Evolution 1992. V. 1(1). P. 3-16.

#### Резюме

Қазақстанның Оңтүстік-Қазақстан және Шығыс-Қазақстан облыстарына экспедициялық шығу нәтижелерінде дәнді өсімдіктердің 14 жабайы түрлердің өсімдіктері жиналды. Ядролық (ITS) және хлоропласттық (*matK*, *rpoC* и *trnL*) геномдарының SNP-танбалағыштарының талдауы Қазақстандағы сараланған жабайы түрлерінің арасындағы дифференциацияны талқылауга және талдауға қатыстырылған ДНК-танбалағыштарының күбылымалық деңгейнің айқындалуына мүмкіндік берді. SNP-танбалағыштардың текстік әртүрлілік деңгейнің салыстырмалы талдауы *matK* (0.030) танбалағышы жабайы өсетін дән дақылдарының молекулалық жүйелерін зерттеуге ен қолайлы және ен полиморфты ДНК-танбалағышы болғаны туралы шешім жасауға мүмкіндік берді. Қазақстандағы жабайы өсетін түрлерінің молекулалық талдауының нәтижелері талқыланған өсімдіктердің ДНК-дескрипторларын колдану негізінде электрондық деректер корын құруға және Қазақстанда жиналған өсімдіктердің генетикалық әртүрліліктерін салыстырмалы зерттеуге қолданылған.

#### Summary

Fourteen different wild grass species were collected during the collection trip in South-Kazakhstan and East-Kazakhstan regions of Kazakhstan. The study of wild cereal species from Kazakhstan by SNP-marker analysis of nuclear (ITS) and chloroplast (*matK*, *rpoC* and *trnL*) genomes allowed to determine the level of variation in studied DNA markers and differentiation among species. The comparative analysis of the genetic variation of the SNP markers is permitted to conclude that *matK* is most polymorphic DNA marker and appropriate for molecular systematic studies of wild plant species. The results of the molecular analysis of wild cereal species from Kazakhstan were used both for comparative studies of the genetic variation in wild species collected in Kazakhstan and for development of the electronic database for the wild species by using polymorphic DNA descriptors.